

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620071152009

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

两株药用植物内生真菌次级代谢产物的  
研究

**Study on Secondary Metabolites Produced by Two Strains of  
Endophytic Fungi Isolated from Pharmaceutical Plants**

薛 珩

指导教师姓名: 沈月毛 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2010 年 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
常用英文缩写词 .....	IV
第一篇 前 言.....	1
一、天然产物概述 .....	1
二、植物内生菌研究概况 .....	4
1 内生菌的起源、分布及其生物多样性.....	4
2 植物内生真菌定义及其研究策略 .....	5
3 植物内生真菌次级代谢产物研究概况.....	6
三、粗榧植物及其内生真菌次级代谢产物研究概况 .....	22
1 粗榧次级代谢产物研究 .....	22
2 粗榧内生真菌次级代谢产物研究 .....	25
四、喜树植物及其内生真菌次级代谢产物研究概况 .....	27
1 喜树次级代谢产物研究 .....	27
2 喜树内生真菌次级代谢产物研究 .....	29
五、本课题研究的目的、内容和意义 .....	31
第二篇 材料与amp;方法 .....	32
一、材料 .....	32
二、方法 .....	33
第三篇 结果与分析 .....	40
一、菌株鉴定 .....	40
1.CM9a 菌株的鉴定 .....	40
2.NXG-06 菌株的鉴定 .....	40
二、粗榧内生真菌 CM9a 菌株次级代谢产物的研究.....	41

1 菌株的发酵及培养物的处理 .....	41
2 菌株次级代谢产物的分离纯化 .....	41
3 化合物的结构解析 .....	48
4 小结 .....	73
<b>三、NXG-06 菌株次级代谢产物的研究 .....</b>	<b>75</b>
1 菌株的发酵及培养物的处理 .....	75
2 发酵产物的分离 .....	76
3 化合物结构解析 .....	77
4 小结 .....	87
<b>第四篇 讨论与结论 .....</b>	<b>89</b>
一、研究成果总结 .....	89
二、讨论 .....	89
<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>91</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>97</b>

## Catalogue

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbreviations of English</b> .....	<b>IV</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Section 1 Advance on natural products</b> .....	<b>1</b>
<b>Section 2 Advance on secondary metabolites from plant endophyte fungi</b> .....	<b>4</b>
1. Origin, distribution and biological diversity of endophytic fungi .....	4
2. Definition and Variety of plant endophytic fungi .....	5
3. Secondary metabolites from Plant endophytic fungi .....	6
<b>Section 3 Secondary metabolites from Cephalotaxus sp. and its endophytic fungi</b> .....	<b>22</b>
<b>Section 4 Secondary metabolites from Camptotheca and its endophytic fungi</b> .....	<b>27</b>
<b>Section 5 Purposes, contents and significance of the thesis</b> .....	<b>31</b>
<b>Materials and methods</b> .....	<b>32</b>
1. Materials .....	32
2. Methods .....	33
<b>Results and analysis</b> .....	<b>40</b>
<b>Section 1 Identification of strains</b> .....	<b>40</b>
<b>Section 2 Study of secondary metabolites from strain CM9a</b> .....	<b>41</b>
1. The solid fermentation and extraction .....	41
2. The isolation of metabolites .....	41
3. Structure elucidation .....	48
4. Discussion .....	73
<b>Section 3 Study of secondary metabolites from strain NXG-06</b> .....	<b>75</b>

1. The solid fermentation and extraction .....	75
2.The isolation of metabolites .....	76
3. Structure elucidation .....	77
4. Disscussion .....	87
<b>Discussion and conclusion.....</b>	<b>89</b>
<b>References .....</b>	<b>91</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>97</b>

厦门大学博硕士论文摘要库



## 摘要

天然产物作为先导化合物对于研究创制新药有着重要的意义,药用植物使用历史悠久,是天然产物的主要来源之一。但是长期的过度开采,使得许多药用植物濒临灭绝。植物内生真菌种类丰富,次级代谢活跃,不仅能产生一些骨架新颖、结构独特的活性产物,还有可能合成与其宿主相同或相似的生理活性物质,为天然药物的研发与生产提供了新资源。在当前药用植物资源日益减少的情况下,开展药用植物内生菌次级代谢产物的研究与开发具有重要意义,不仅可以解决植物资源缺乏、再生周期长的限制,还具有可大量生产、降低成本、减少污染,不受时空限制等优点。

近年来,关于内生真菌的研究进展十分迅速,尤其是从内生真菌中筛选到许多具有生物活性的化合物,包括抗癌活性物质、抗菌活性物质及其他活性成分。种类有生物碱类、萜类、苯基丙酸和木酚素类、酚类、醌类、内酯类、甾体类、脂肪族类等。

本论文以来源于两株药用植物(粗榧和喜树)的内生真菌为研究对象,对粗榧内生真菌 *Aspergillus* sp. CM9a 和喜树内生真菌 *Botryosphaeria* sp. NXG-06 的次级代谢产物进行分离纯化和结构鉴定,共分离并鉴定了 18 个化合物,其中 6 个为新化合物。

其中从菌株 *A. sp.* CM9a 的 PDA 平板发酵提取物中分离并鉴定了 13 个化合物,包括 2 个酮类化合物 (C2C、C2D), 2 个醌类化合物 (CM3、E4B), 2 个甾体类化合物 (F3A、H1B), 1 个二苯醚类化合物 (CM4), 3 个哌嗪二酮衍生物 (CM1、CM8、CM9), 1 个内酯类化合物 (CM13), 2 个生物碱类化合物 (CM30, C2A)。其中四个新化合物: C2A, CM3, CM1 和 CM13; 化合物 CM4 首次从植物内生真菌中分离得到。

从菌株 *Botryosphaeria* sp. NXG-06 的次级代谢产物中分离并鉴定了 5 个化合物,包括酮类化合物 (G02)、萜类化合物 (G13、G14)、生物碱类 (G09) 和内脂类 (G08) 化合物。其中 G02, G09 为新化合物, G13、G14 是二倍半萜类化合物。

用纸片扩散法对新化合物 C2A、CM3、CM1、CM13, G02 和 G09 的抗菌

活性进行了研究,在样品浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{paper}$  时,**CM3** 表现中等抗细菌活性,**C2A**、**CM13** 有微弱抗细菌活性,而其余化合物均无明显抗细菌及抗真菌活性。

本论文的研究结果表明,**CM9a** 及 **NXG-06** 菌株的次级代谢产物结构类型丰富,具有产生化学结构新颖化合物的潜能,值得开展深入的研究。

**关键词:** 药用植物; 内生真菌; 次级代谢产物

## Abstract

Nature products are important source of lead compounds in Medicine. Pharmaceutical plants are major sources of natural products, but over-exploitation leads many of them facing extinction. Endophytes from pharmaceutical plants, not only produce sorts of novel bioactive metabolites, but also may synthesis the same or similar products by the hosts, providing a new resource for drug discovery. As pharmaceutical plant resources are declining, the research on endophytes isolated from medicinal plant not only can solve the problem of resources, but also provides a new way to quantity production.

In this thesis, the secondary metabolites of two endophytic strains (*Aspergillus* sp. CM9a from *Cephalotaxus manni* and *Botryosphaeria* sp. NXG-06 from *Camptotheca acuminata*) were investigated. Eighteen compounds were isolated and elucidated from these two strains, including six new compounds.

The secondary metabolites of the strain *A.* sp. CM9a from PDA solid fermentations were studied. Thirteen compounds were isolated, including ketones, anthraquinones, sterols, diphenyl ether, diketopiperazines, lactone and alkaloids. Among them, four new compounds (**C2A**, **CM3**, **CM1**, **CM13**) were obtained. Compounds **CM4** were isolated from plant endophytic fungi for the first time.

Five compounds were isolated from the strain *B.* sp. NXG-06, including ketones, terpenoids, alkaloids and lactone. Two of them were new compounds (**G02**, **G09**).

In the antimicrobial test of isolated novel compounds, **CM3** showed moderate antibacterial activity while the antibacterial activities of **C2A** and **CM13** were weak.

In conclusion, our results indicated that the plant endophytic fungi, CM9a and NXG-06, may produce different kinds of novel compounds and were worth to be researched in-depth.

**Key words:** Medical plant; Endophytic fungi; Secondary metabolisms

## 常用英文缩写词

缩写式	全称
COSY	correlated spectroscopy
DEPT	distortionless enhancement by polarlization transfer
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation
$\delta$	chemical shift
dd	doublet of doublet
s	singlet
d	doublet
t	triplet
q	quartet
m	multiplet
R <sub>f</sub>	relative mobility
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
RP-18	reversed-phase octadecyl silica gel
HPLC	high performance liquid chromatography
TLC	thin layer chromatography
h	hour
drop/min	drop per minute
drop/tube	drop per tube
s/tube	second per tube
r/min	revolutions per minute
mg	milligram
$\mu\text{g}$	microgramme
IC <sub>50</sub>	concentration giving 50% of maximal inhibition
MIC	minimum inhibitory concentration

## 第一篇 前言

### 一、天然产物概述

天然产物是指具有生物活性且来源于植物、动物和微生物等自然资源的化合物<sup>[1]</sup>。人类对天然产物的利用可以追溯到数千年前，古印度与中国对植物天然成分的利用。事实上，大部分早期药物正是基于对天然产物进行化学、药理学和临床学方面的研究而开发出来的，如阿司匹林，吗啡和奎宁<sup>[2,3]</sup>（图 1-1）。

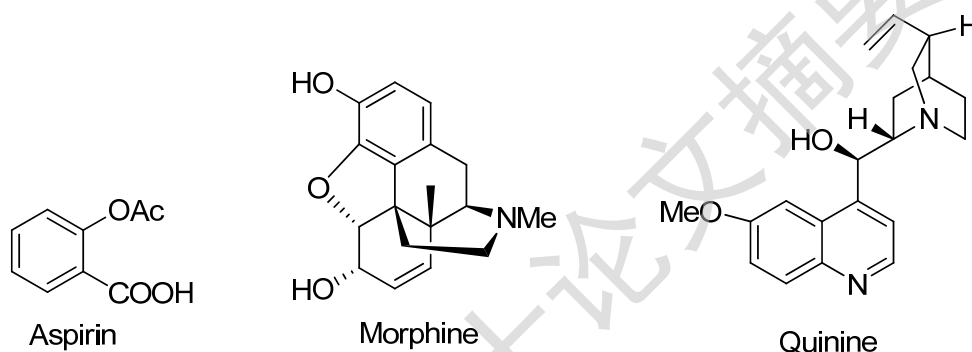


图 1-1 化合物 aspirin, morphine 和 quinine 的结构

Fig. 1-1 The chemical structures of aspirin, morphine and quinine.

资料来源: Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. [J]. J Nat Prod, 2004. 67(12): 2141-2153.

天然产物的研究推动了现代药物发现的进程，而结构新颖，作用独特的天然产物的寻找成为新药研发中关键的第一步<sup>[4]</sup>。目前，约 40% 的处方药是以天然产物为基础的，而在美国食品与药物监督局（FDA）注册的化学品中，49% 为天然产物及其衍生物<sup>[5]</sup>；根据美国国立肿瘤研究所（NCI）D J Newman 等人 2007 年的一项调查，1981~2006 年间全世界推出的 974 个药物小分子新化学实体（NCEs）中，50.4% 可追溯到天然产物。其中包括：天然产物（6%），天然产物衍生物（28%），以及基于来自天然产物知识而设计的合成化合物，即天然产物的模仿物（17%）<sup>[6]</sup>。

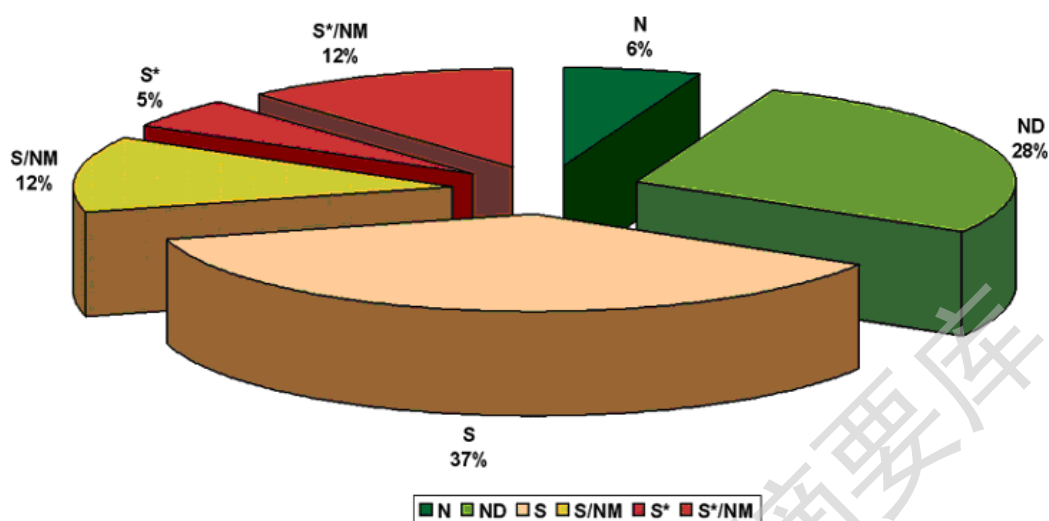


图 1-2 1981 至 2006 年间小分子药物的来源，共 974 个<sup>a</sup>（按百分比计算）

Fig. 1-2 Sources of small molecule drugs, 1981–2006: all categories, N=974  
(in percentages)

a: N: 天然产物; ND: 来源于天然产物，通常经过半合成的化学修饰; S: 完全化学合成; S\*: 完全化学合成，但是药效团来自天然产物; NM: 是指根据从天然产物获得的信息/知识进行药物设计; S/NM: 完全化学合成，并结合了 NM; S\*/NM: 利用天然产物药效团进行完全化学合成，同时结合了 NM.

资料来源: Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. [J]. J Nat Prod, 2007. 70(3): 461-477.

然而，过去的几十年间，随着 X 衍射和 NMR 技术的更新，合理药物设计和组合化学等药物发现方法的发展，天然产物药物的开发面临巨大的压力。许多主要的医药企业也中止或削减了天然产物研究计划，把更多精力转而投入到新方法上，但是到目前为止取得的进展却十分有限<sup>[7,8]</sup>。

与此相反，随着分析技术，光谱技术和高通量筛选技术的发展，天然产物研究取得突破性进展，更多的天然先导化合物进入了临床应用，尤其是在抗感染和治疗癌症方面，73.3%的抗菌化合物（表 1-1）和 76%的抗肿瘤化合物（图 1-3）都与天然产物有关<sup>[6]</sup>，占据主导地位，充分表明天然产物在新药及新药先导化合物的开发中仍将继续发挥着举足轻重的地位。

表 1-1. 1940 年至 2006 年间抗感染药物的来源，共 230 个<sup>b</sup>Fig. 1-1 All antiinfective (Antibacterial,Fungal,Parasitic,and Viral) Drugs  
(N=230)

Indication	Total	B	N	ND	S	S/NM	S*	S*/NM	V
Antibacterial	109		10	64	23			1	11
Antifungal	29	1		3	22	3			
Antiparasitic	14		2	5	4		2		1
Antiviral	78	12		2	7	1	20	12	25
Total	230	13	12	74	56	4	22	12	37
percentage	100	5.7	5.2	32.3	24.5	2.2	9.6	4.8	15.7

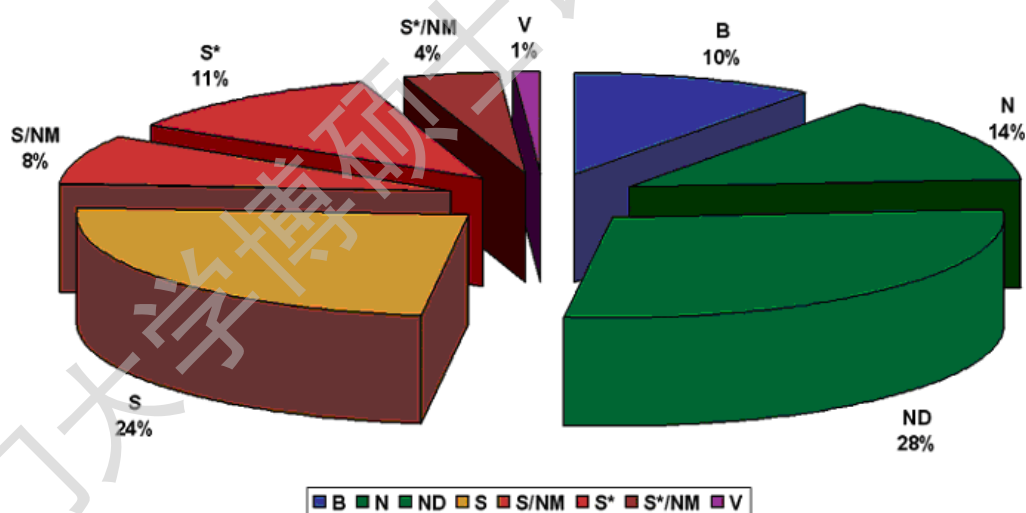
图 1-3 1940 年至 2006 年间抗癌药物的来源，共 175 个<sup>b</sup>（按百分比计算）

Fig. 1-3 All available anticancer drugs, 1940s–2006,by source, N=175 (in percentages)

b: B: 生物大分子，细胞株或有机体产生的超过 45 个残基的氨基酸或蛋白质； N: 天然产物； ND: 来源于天然产物，通常经过半合成的化学修饰； S: 完全化学合成； S\*: 完全化学合成，但是药效团来自天然产物； NM: 是指根据从天然产物获得的信息/知识进行药物设计； S/NM: 完全化学合成，并结合了 NM； S\*/NM: 利用天然产物药效团进行完全化学合成，同时结合了 NM； V: 疫苗

资料来源: Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. [J]. J Nat Prod, 2007. 70(3): 461-477.

## 二、植物内生菌研究概况

随着全球耐药病原体和各种传染病的不断出现, 以及癌症、心脑血管疾病、老年性痴呆症等疑难疾病对人类健康的威胁日益严重, 迫切需要应用新的策略和从新的来源加快先导化合物的寻找和发现。植物内生菌生境特殊, 是天然产物的重要来源。

### 1 内生菌的起源、分布及其生物多样性

内生菌(endophyte)是一类在其部分或全部生活史中存活于健康植物组织内部, 而不使宿主植物表现出明显感染症状的微生物。它包括细菌、真菌、放线菌, 也包括那些生活史中某一阶段表面生的腐生菌, 对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原菌和菌根及腐生菌等<sup>[9]</sup>。

第1株内生菌是1898年Vogl从黑麦草 *Lolium temulentum* 的种子中分离出来的<sup>[10]</sup>。但在此后的70年间, 植物内生菌的研究进展缓慢, 直至20世纪70年代, 人们发现高羊茅中的内生真菌和毒素麦角生物碱的产生有关, 此后植物内生菌的研究才引起了广泛的重视。

目前关于内生菌的起源问题有着多种假说, 大致分为三类: 一是垂直传播, 内生菌通过植物种子进行传递<sup>[11]</sup>; 二是水平传播, 内生菌通过对植物细胞纤维素的降解, 破坏植物细胞壁, 从而进入植物体内<sup>[12]</sup>; 三是根际菌通过植物侧根的裂缝进入植物当中, 经过长期的协同进化, 与植物建立了一种和谐的内生关系, 成为内生菌<sup>[13]</sup>。

依据茎叶化石分析, 内生菌在高等植物形成初期就已普遍存在于植物中<sup>[9,13]</sup>, 内生菌存在于目前所有已知植物中, 广泛分布于植物的根、茎、叶、花、果实和种子等器官组织的细胞或细胞间隙中, 并且种类、数量、分布都因植物种类不同而异。地球上已知植物约为30万种, 每一种植物都有一种或多种内生菌与之共生, 内生菌的丰富的生物多样性和存在的普遍性为其研究提供了最基本的保证。目前已从植物体中分离到了属于细菌、酵母菌、放线菌和丝状真菌的多种内生菌, 并发现许多新种。

内生菌与宿主植物在长期共进化过程中, 形成了密切的互惠共生关系: 一方面, 内生菌可以从宿主植物中吸取营养, 供自己生长所需; 另一方面内生菌能够



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库